

建立 NHEJ 修复定量体系并检测拓扑异构酶抑制剂依托泊苷对 NHEJ 的影响

李莉萍 吴晓丹 孙有湘 陈利俊

摘要 目的 建立含 pI-SCE I 酶切位点的总的非同源末端连接 (total non-homologous end joining, Total-NHEJ) 和非经典末端连接 (alternative end joining, A-EJ) 修复底物的细胞株, 设置特定的流式细胞术参数, 定量检测依托泊苷 (etoposide, VP-16) 对非同源末端连接 (Non-homologous end joining, NHEJ) 修复的影响。方法 本实验通过脂质体转染含修复底物的质粒, 嘌呤霉素筛选, 构建起 NHEJ 修复系统的稳定细胞株; 运用流式细胞术和 PCR 技术对所构建的细胞株的基因组 DNA 进行分析与鉴定; 运用细胞免疫荧光及基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测 VP-16 诱导的 DNA 双链断裂 (DNA double strand break, DSB) 损伤, 运用流式细胞术定量检测 VP-16 对 NHEJ 修复的影响。结果 在所筛选的细胞中的各得到 2 株阳性细胞株 Total-NHEJ 和 2 株阳性细胞株 A-EJ。VP-16 作用浓度和时间的增加, Total-NHEJ 和 A-EJ 修复效率增加。结论 VP-16 诱导 DNA 损伤的同时, 促进总 NHEJ 修复和 A-EJ 修复, 修复呈现剂量和时间依赖性, 但随着浓度和作用时间的增加, VP-16 致 DSB 的损伤能力超过修复能力。

关键词 稳定转染 非同源末端连接 非经典末端连接 依托泊苷

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.009

Establishing NHEJ Repair Quantitative Detection System and Detecting the Roles of Topoisomerase Inhibitors Etoposide on NHEJ. Li Liping, Wu Xiaodan, Sun Youxiang, et al. Guangdong Medical College Graduate Department, Guangdong 523808, China

Abstract Objective To establish two cell lines containing restriction site of pI-SCE I and separately reporters of total-NHEJ (total non-homologous end joining) and alternative end joining (A-EJ), set specific parameters of flow cytometry to detect the role of etoposide (VP-16) played in total-NHEJ and A-EJ quantificationally. **Methods** In this study, we transfer plasmids containing repair substrates using liposomal, establish stable cell lines of NHEJ repair system by subsequent puromycin screening, identified genomic DNA of the two cell lines by flow cytometry and PCR, detected VP-16-induced DSB damage by immunofluorescence and genomic DNA agarose gel electrophoresis, detected the effect of VP-16 on NHEJ repair using flow cytometry quantificationally. **Results** Among the clones, 2 clones belongs to pI-SCE I⁺ Total-NHEJ cells, and 2 clones belongs to pI-SCE I⁺ A-EJ cells. With the increase of VP-16 concentration and action time, NHEJ repair effects increased. **Conclusion** The results showed that VP-16 induced DNA damage at the same time, promoted the total NHEJ repair and A-EJ repair. The repair is dose and time dependent, but with the increase of concentration and action time, the capacity VP-16 cause to DSB damage exceeds its repair effects.

Key words Stable transfection; Non-homologous end joining; Alternative end joining; Etoposide

DNA 双链断裂 (DNA double strand break, DSB) 是基因组发生的损伤, DSB 不及时进行修复, 可导致细胞死亡, 而错误的修复会引起基因突变甚至肿瘤发生。非同源末端连接 (non-homologous end joining,

NHEJ) 是哺乳动物的 DSB 损伤主要的修复通路之一。NHEJ 分为经典的非同源末端连接 (classical non-homologous end joining, C-NHEJ) 和非经典末端连接 (alternative end joining, A-EJ)^[1]。Total-NHEJ 为 C-NHEJ 和 A-EJ 的总和, C-NHEJ 仅将 DSB 的两断端稍做加工处理甚至不处理就直接连接, 这种连接过程中经常伴有 DSB 缺口周边序列的轻微改变^[2]。由于哺乳类基因组中非编码区占据了大部分, C-NHEJ 几个碱基的变化一般不会引发其原基因序列的删除改变, 故而经常被机体所容忍。然而在 KU 基因缺陷时细胞会进行 A-EJ 的修复, 利用广泛

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271436); 广东省科技计划项目 (2010B060900109); 广东省自然科学基金资助项目 (S2012010008225); 广东省中医药局课题 (1050051)

作者单位: 523808 东莞, 广东医学院研究生学院 (吴晓丹、陈利俊); 523808 东莞, 广东省医学分子诊断重点实验室 (李莉萍、吴晓丹、孙有湘、陈利俊) (注: 李莉萍、吴晓丹为共同第一作者)

通讯作者: 李莉萍, 电子信箱: lipingdmc@126.com

存在于基因组 DNA 内的短重复序列(只有几个核苷酸大小),形成、匹配并连接微小同源的短 ssDNA,而造成位居中间的片段丢失或易位,是一种后备的修复通路,相对于 C-NHEJ,其具有显著的致突变性错误修复的倾向^[3,4]。故本实验使用 KU 基因缺陷的 CHO 细胞,即 XRS5 细胞来模拟 A-EJ 修复体系,使用基因完整的 CHO 细胞来模拟 Total-NHEJ 修复体系。以往只能通过观察一些关键蛋白如 KU80、Ctip 等的表达情况来间接反映 NHEJ 的修复情况,而本实验所要构建的细胞株能直接对之进行定量分析,达到更直观更准确的检测目的。笔者所使用的质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 由 Stark 工作室构建的,分别整合有 Total-NHEJ 和 A-EJ 修复底物的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)缺陷基因,其构建得到的 EJ5-GFP/CHO 细胞株和 EJ2-GFP/XRS5 细胞株,分别对应 Total-NHEJ 和 A-EJ 的修复通路^[5]。依托泊苷(etoposide, VP-16)为 DNA 拓扑异构酶的抑制剂,是临床上常用的一种抗肿瘤药物,有研究表明 VP-16 对细胞同源重组修复(homologous-recombination, HR)具有促进的作用,然而尚未见报道说明 VP-16 对细胞的 NHEJ 修复的作用是如何的。本实验通过流式细胞术来直接定量检测 VP-16 与 NHEJ 修复通路的之间的关系,为抗肿瘤药物的临床用量提供指导。

材料与方法

1. 材料:质粒 EJ5-GFP 和 EJ2-GFP(由美国 Stark 研究室 Jeremy M. Stark 教授惠赠)、质粒 pcDNA3.1、pI-SCE I、pGFP(本课题组保存)、CHO 细胞(由暨南大学余榕捷教授惠赠)、XRS5 细胞(购于 ATCC)、puromycin(购于 Sigma 公司)、限制性核酸内切酶(购于 NEB 公司)、Etoposide(购于 Selleck-Chem 公司)。

2. 质粒 DNA 制备:质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 分别包含带 pI-SCE I 限制性内切酶的 Total-NHEJ 和 A-EJ 修复底物的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)缺陷基因^[5],通过转染和表达 pI-SCE I 限制性内切酶,在 GFP 缺陷基因中产生 DSBs 缺口,如这种缺口按照对应的 NHEJ 路径被成功修复,将恢复 GFP 基因的完整性,细胞表达绿色荧光蛋白而被流式细胞仪识别^[6]。将这两种质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中扩增,质粒 DNA 经提纯后用限制性内切酶酶切鉴定。

3. 线性化质粒 DNA 与细胞转染筛选:质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 分别使用限制性内切酶 Xho I 和 Hpa I 单酶切线性化(酶切位点避开了功能基因)分别转染 CHO 细胞和 XRS5 细胞。实验设计分无转染组(空白对照)、和目的基因转染组。各实验组均同时培养 3~4 个培养皿(100mm)的细胞。使用嘌呤霉素对转染细胞进行筛选(质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 包

含嘌呤霉素抗性基因)得到稳定细胞株。经转染前进行嘌呤霉素浓度梯度的实验得出,嘌呤霉素对 CHO 细胞和 XRS5 细胞的最低有效致死浓度分别为 1.5 $\mu\text{g/ml}$ 和 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 。用此浓度对转染细胞筛选 3~4 周,直至无转染组的细胞全部死亡,以及目的基因转染组形成明显的细胞集落为止。然后随机转移 8 个明显的细胞集落(编号 1~8#),转种到 24 孔板以含嘌呤霉素的培养液进行培养和扩增。最后从各自的 8 个细胞集落中选择经反复筛选仍生长良好的 2 株转染细胞进行液氮冻存和鉴定。

4. PCR 法对含有质粒细胞的鉴定:若线性化的质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 成功被整合到细胞的染色体上,则可以从筛选的细胞中通过提取基因组 DNA,再利用 PCR 的方法加以鉴定。因线性化的质粒 EJ5-GFP、EJ2-GFP 都含有不完整的 GFP 片段,所以选取其中所含有的 GFP 片段中的一部分(106bp)为扩增片段,实验设有阴性对照组(未转染质粒的 CHO 细胞组)、EJ5-GFP 质粒组、EJ2-GFP 质粒组、EJ5-GFP/CHO 细胞组、EJ2-GFP/Xrs5 细胞组、阳性对照组(质粒 GFP 组),引物为上海生物工程公司合成,上游引物:5'-GAGCGCACCATCTTCTTCA-3';下游引物:5'-AGTCGATGCCCTTCAGCTC-3'。

5. γ -H2AX foci 的荧光检测:将 CHO 细胞接种于 24 孔板,12h 后待细胞贴壁牢固,换液并加入不同浓度的 VP-16,设 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度组,并设 VP-16 的空白对照组,每一时间/浓度组设 2 个复孔。按 24、48、72h 3 个药物作用时间点分别将相应孔中的盖玻片上的细胞固定, γ -H2AX 的一抗(1:500)、二抗(1:500)孵育,DAPI 染色后封片,DM2500 荧光显微镜下拍照,计数 200 个细胞并统计每个细胞中 foci 数目,实验重复 3 次。

6. DNA 琼脂糖电泳检测:分别收集 2.0、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 VP-16 孵育 24、48、72h 后的 CHO 细胞,提取细胞的基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测。

7. 定量分析 Total-NHEJ 和 A-EJ:分别将构建好的 EJ5/CHO 细胞和 EJ2/XRS5 细胞接种于 24 孔板,24h 后待细胞贴壁牢固,细胞汇合度达到 70%~80%,转染质粒 pcDNA3.1-pI-SCE I、pGFP,并在不同的时间加入不同浓度的 VP-16,设 1.0、2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 4 个浓度组,设 24、36、48、72h 4 个时间点,并设 VP-16 的空白对照组,每一时间/浓度组设 2 个复孔。收集细胞,进行流式细胞仪检测,计数表达绿色荧光蛋白 GFP 阳性细胞百分比。使用强表达 GFP 绿色荧光蛋白的 pGFP 质粒来设置阳性对照孔,用于校正各不同处理组间的转染效率,实验重复 3 次。

8. 统计学方法:采用统计软件 GraphpadPrism5 分析,定量数据的比较采用双尾 t 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 质粒酶切、线性化电泳以及 PCR 产物电泳鉴定:质粒 EJ5-GFP 使用 Nde I 酶切得到约 4.5kb 大

小的酶切片段,质粒 EJ2 - GFP 用 Hind III 和 pst I 进行双酶切得到约 3.5kb 大小的酶切片段,对构建的稳

定细胞株提取基因组 DNA 进行 PCR,产物大小在 106bp 左右,与文献参考值一致(图 1)^[5]。

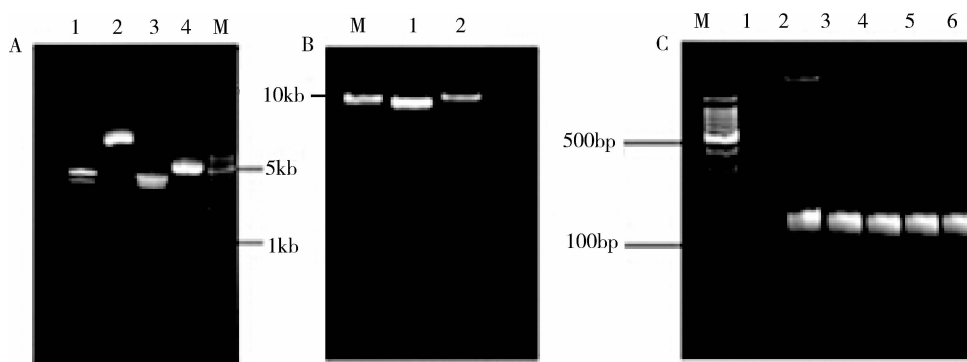


图 1 DNA 电泳图

A. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳质粒酶切图。1. 质粒 EJ5 - GFP 经 Nde I 酶切产物; 2. 质粒 EJ5 - GFP; 3. 质粒 EJ2 - GFP 经 Hind III 和 pst I 酶切产物; 4. 质粒 EJ2 - GFP; M. 10000bp marker。B. 1.0% 琼脂糖凝胶电泳线性化质粒图。1. 质粒 EJ5 - GFP 经 Hpa I 酶切产物; 2. 质粒 EJ2 - GFP 经 Xho I 酶切产物; M. 10000bp marker。C. 2.0% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物图。1. CHO 基因组 DNA 的 PCR 产物; 2. 质粒 EJ5 - GFP 的 PCR 产物; 3. 质粒 EJ2 - GFP 的 PCR 产物; 4. EJ5 - GFP/CHO 基因组 DNA 的 PCR 产物; 5. EJ5 - GFP/CHO 基因组 DNA 的 PCR 产物; 6. 质粒 GFP 的 PCR 产物; M. 1000bp marker

2. NHEJ 修复效率检测体系各项参数的设置: 本实验使用 7 氨基放线菌素 D (7 - AAD) 来界定活细胞区, 7 - AAD 是一种经典的核酸标记染料, 在流式细胞术中能够代替 PI 染料用于标记死细胞, 以去除死细胞对实验的影响, 因此我们以无染料的 7 - AAD (unstained) 组细胞设定存活率 (viability) 为 100%; 用未经任何处理的 7 - AAD 染色细胞 (stained), 经过设定 scatter、SSC 和 FSC 区, 选取成单的活细胞来计数; DSBs 修复是极小概率发生事件, 增大发射电压和计

数细胞数, 有利于提高检测的灵敏度。所以, 设定 GFP 的光电倍增管电压为 575V, 每一样品收集 100000 个细胞; 同样的理由, 为提高 GFP 阳性细胞检出率, 用 EJ5 - GFP、EJ2 - GFP 阴性细胞即 CHO、XRS5 细胞设定 GFP 阳性细胞区, 使其刚好 GFP = 0; 待检测细胞加 7 - AAD 染色后上机。通过采取这些参数设置, 本实验中形成了一套敏感度强、可重复性良好的操作体系 (图 2)。

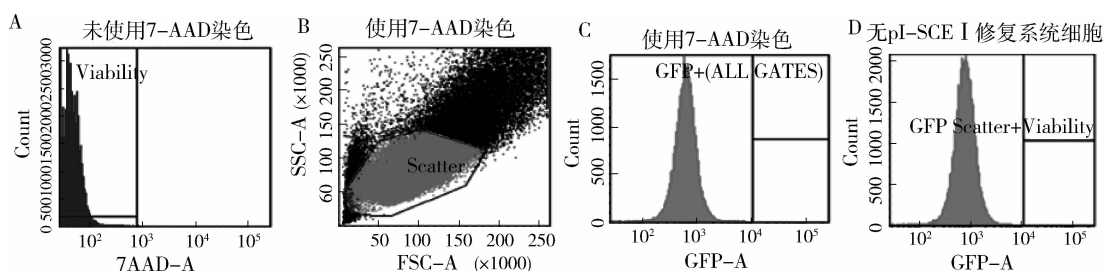


图 2 DNA 修复系统各参数的设置

A. 未使用染料 7 - AAD 来设定细胞的存活区为 100%; B、C. 7 - AAD 染料来区分存活的单细胞; D. 未转染质粒 EJ5 - GFP 的 CHO 细胞来设定 GFP 为 0.00%

3. VP - 16 作用于 CHO 细胞产生 DSB 损伤: VP - 16 作用于 CHO 细胞 48h 后, 蛋白免疫荧光检测 γ - H2AX foci, 结果得到对照组、2.0、5.0、10.0 μ mol/L 处理组平均每个阳性细胞内 foci 数量分别为

0.88 ± 1.13 、 10.37 ± 3.16 、 19.25 ± 5.00 和 31.00 ± 8.75 。经 5.0 μ mol/L 的 VP - 16 处理 CHO 细胞, 于 24、48、72h 3 个时间检测对照组、24、48、72h 处理组中平均每个 foci 阳性细胞内 foci 计数结果为: $0.75 \pm$

1.17、11.00 ± 3.36、17.5 ± 5.3、31.8 ± 6.7。结果显示 VP-16 随着浓度和时间的增加,γ-H2AX 出现的

数量随之逐渐增多,制造链断裂损伤能力加强(图 3)。

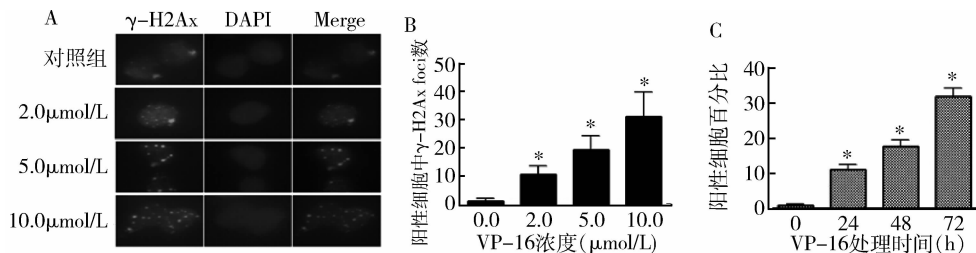


图 3 VP-16 对 CHO 细胞 γ-H2Ax 灶 (foci) 产生的影响

A、B. 不同浓度的 VP-16 作用于 CHO 细胞 48h, 荧光显微镜下观察计数; C. 5.0 μmol/L VP-16 分别作用于 CHO 细胞 0、24、48、72h, 荧光显微镜下计数各细胞中 foci 数目 (foci > 5 个/细胞视为阳性, 计数细胞 n > 100) 与 oh 组比较, * P < 0.01

4. DNA 琼脂糖电泳检测 VP-16 在细胞中诱导 DNA 断裂损伤: 结果显示, CHO 细胞经 VP-16 不同浓度及时间处理后, 基因组 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳可见较为明显的涂布状条带。其中 5.0 μmol/L VP-16 作用于 CHO 细胞 48h, 可产生大量 DNA 小片段, 经 120V, 15min 琼脂糖电泳在条带前端位置可见明亮的小分子 DNA 碎片聚集带 (图 4)。

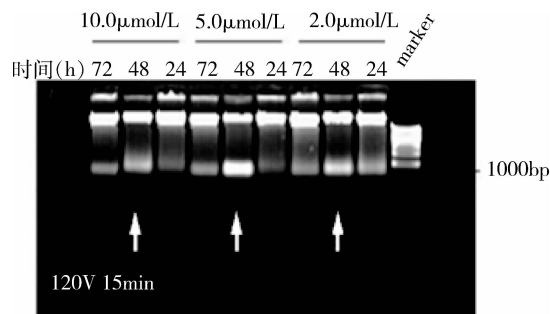


图 4 VP-16 不同剂量及作用时间对 CHO 细胞 DNA 损伤的影响

不同浓度 VP-16 2.0、5.0、10.0 μmol/L 分别作用于 CHO 细胞 24、48、72h, 提取其基因组 DNA, 进行 1.0% 琼脂糖电泳

5. 所构建的阳性细胞的鉴定: 结果显示 EJ5/CHO 和 EJ2/XRS5 细胞转染空载质粒 pcDNA3.1 得到的 GFP 阳性细胞百分比分别为 0.082% 与 0.031%; 转染质粒 pI-SCE I 得到的 GFP 阳性细胞百分比分别为 0.804% 与 0.245%; 而转染质粒 pGFP 得到的 GFP 阳性细胞百分比分别为 66.581% 与 39.324%。提示整合在其基因组的底物能被转染表达的 pI-SCE I 内切酶识别, 诱导产生 DSBs 然后修复, 表达绿色荧光蛋白而被流式细胞仪所识别。对比阴性对照, 其数值发生了约 10 倍的跃迁, 展现出明显的区分度, 能达到作为一种检测工具的要求

(图 5)。

6. VP-16 促进 NHEJ 修复: 运用流式细胞仪检测, 诱导的修复效率 (induced NHEJ, %) 为 pI-SCE I 转染孔的 GFP 阳性细胞百分比与 pcDNA3 转染孔的 GFP 阳性细胞百分比之差, 其转染效率由 pGFP 转染孔 GFP 阳性细胞百分比校正。结果显示随着时间和浓度的增加, 所检测到的 Total-NHEJ 和 A-EJ 修复所产生的 GFP 阳性细胞检测量增加, 其中在 2.0 μmol/L 和 4.0 μmol/L VP-16 作用时 Total-NHEJ 和 A-EJ 与各自的对照组相比, P < 0.05, 差异具有统计学意义; 1.0 μmol/L 和 2.0 μmol/L 的 VP-16 作用于 Total-NHEJ 在 36h 和 48h 时与对照组相比, P < 0.05, 差异具有统计学意义; 而 1.0 μmol/L 和 2.0 μmol/L 的 VP-16 作用于 A-EJ 时分别是在 24、36h 和 36、48h 时与对照组相比, 差异具有统计学意义 (P < 0.05, 图 6)。

讨 论

本实验构建的两株细胞, 通过 PCR 和流式细胞仪方法进行检测表明能稳定表达 pI-SCE I, 可用于进行 NHEJ 修复通路的研究。

组蛋白 H2A 的变体 H2AX, 其 139 位丝氨酸位点上发生磷酸化成为 γ-H2AX, 它被普遍认为是 DSB 发生的敏感标志, 并且 γ-H2AX 在 DSB 损伤位点的累积能为修复蛋白向损伤位点聚集提供重要信号^[7,8]。在本实验中笔者检测 γ-H2AX 灶 (foci) 的形成, 作为 DSB 损伤产生及修复动态变化的监测指标^[9]。有研究表明, VP-16 可显著降低 II 型 DNA 拓扑异构酶活性, 在基因组 DNA 中制造双链断裂损伤^[10]。图 3 可以看出, 随着 VP-16 的浓度跟处理时间的增加, 细胞核中 γ-H2AX foci 出现的数量增多,

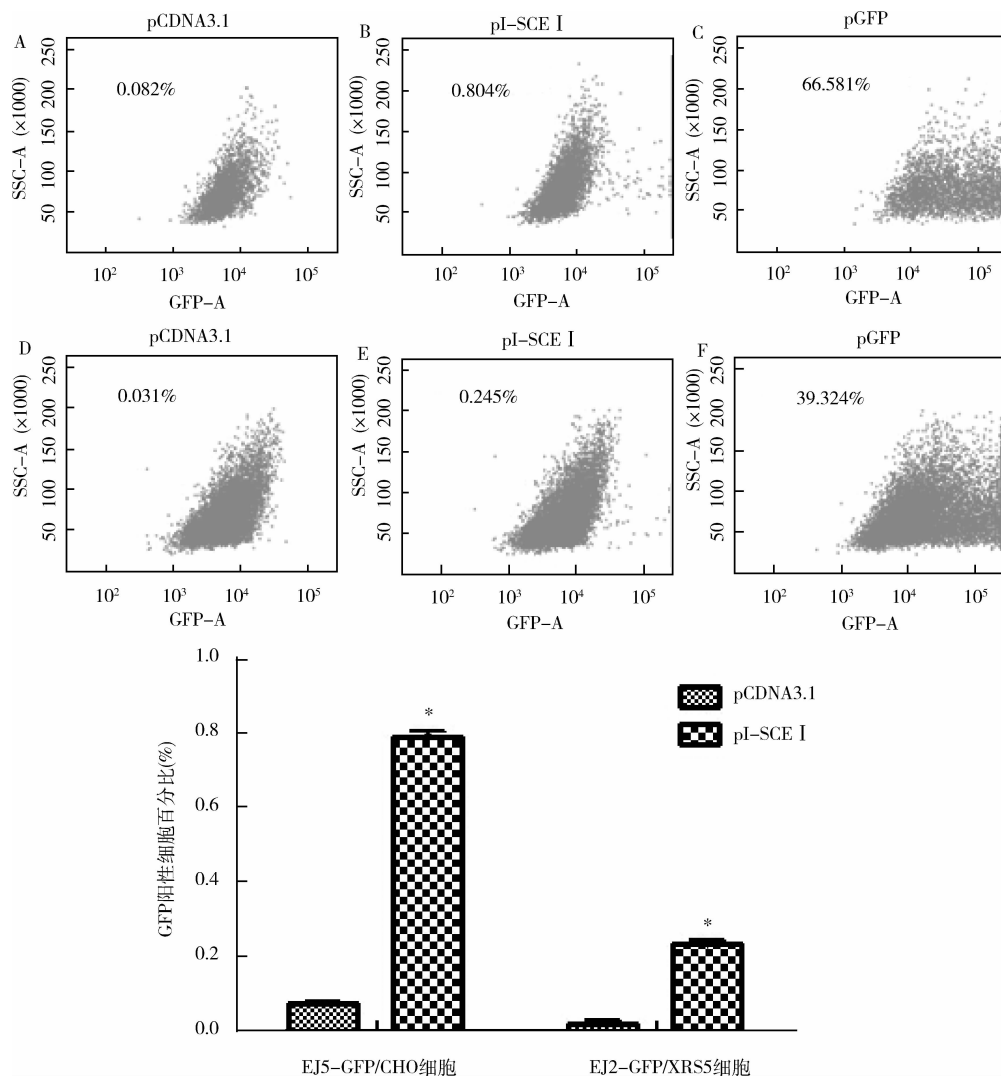


图5 通过流式细胞术对所筛细胞进行鉴定

A ~ C. EJ5 - GFP/CHO; D ~ F. EJ2 - GFP/XRS5; 对照组转染质粒 pCDNA3.1, 而实验组转染质粒 pI - SCE I; 实验重复 3 次, 与 pCDNA3.1 相比, * $P < 0.01$

表示 VP-16 制造链断裂损伤能力也加强。图 4 可见 $5.0 \mu\text{mol/L}$ VP-16 处理 CHO 细胞 48h, 许多小片段 DNA 聚集而形成一条明亮条带, 出现在涂布状条带前端, 说明在 $5.0 \mu\text{mol/L}$ VP-16, 48h 处理条件下, VP-16 诱导 DNA 断裂损伤的作用明显超出了细胞的修复能力; 继而, 随着处理时间增长, 在 72h 时间点, 此条带减弱, 说明相较于 48h 时, 部分断裂的小 DNA 片段发生了修复连接成为较大的片段。从实验结果可以发现, 在 VP-16 作用于细胞产生 DSB 的同时, 细胞自身也进行着修复, 随着 VP-16 处理时间增长, 损伤与修复的相对关系也在改变。

Ferrara 等^[11]研究表明随着 VP-16 浓度不断增加, HR 修复也增加, 说明 VP-16 对 HR 的修复具有

促进的作用; 但是 Quennet 等^[12]和 Adachi 等^[13]研究表明由 VP-16 造成的 DNA 损伤主要是通过 NHEJ 来进行修复的。通过本实验的结果图 6 可以看出随着浓度或者作用时间的增加, VP-16 对 Total - NHEJ 和 A - HJ 的修复都具有促进作用, 这与 Quennet 等^[12]和 Adachi 等^[13]的研究是相符的。但是在 72h 时检测到的 GFP 阳性细胞百分比降低, 这并不是因为修复降低, 可能由于损伤加强, 使得基因组 DNA 被切成更小更多的小片段, 将能表达成 GFP 的片段给切碎, 致使仪器检测到 GFP 的表达量下降。在受损的细胞中, C - NHEJ 能正确修复细胞 DNA 使其继续细胞周期, 传入子代细胞; 然而 A - EJ 会导致错误的修复, 此修复途径可能使原本正常的细胞发生恶化,

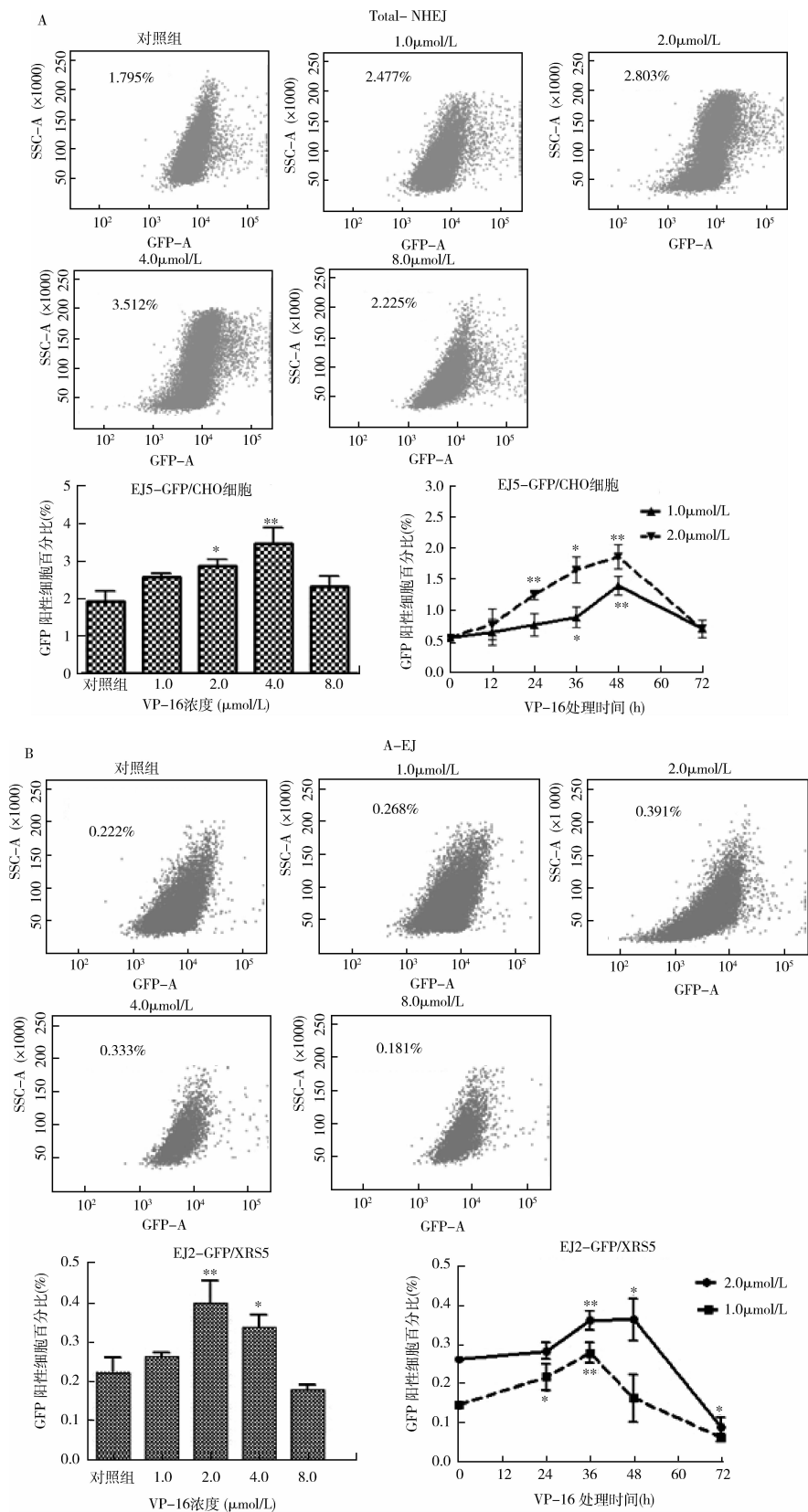


图6 VP-16促进NHEJ的修复效率

A. 流式细胞仪检测不同浓度的VP-16对限制性内切酶pI-SCE I诱导DSB损伤的Total-NHEJ修复效率;B. 流式细胞仪检测不同浓度的VP-16对限制性内切酶pI-SCE I诱导DSB损伤的A-EJ修复效率,实验重复3次,与对照组(或0h)比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

甚至导致肿瘤的发生,当细胞发生 A - EJ 时具有潜在成瘤风险。由于 VP - 16 在细胞 S 期或 G₂ 期,干扰 DNA 拓扑异构酶 II 的功能,致使受损的 DNA 不能修复,从而诱导肿瘤细胞死亡,因而在临床上将其作为抗肿瘤药物,应用于小细胞肺癌、急性白血病、恶性淋巴瘤、睾丸肿瘤、膀胱癌、前列腺癌等疾病的治疗^[14]。然而,需要引起重视的是,在应用 VP - 16 化疗时,其具有使肿瘤细胞中损伤的 DNA 重新被修复的功能;而对于正常细胞中发生的 DSB,若发生 A - EJ 导致修复错误,则致使组织细胞带上突变基因,从而使化疗患者获得新的潜在致瘤因素。从本实验可以看出,只有在药量足够大、用药时间足够长时才能弥补这一风险。这一发现对于临床治疗中 VP - 16 的用药原则与用药方案具有重要的指导意义。

参考文献

- 1 孙有湘,周克元,李莉萍.组蛋白去乙酰化酶抑制剂对双链断裂修复路径的作用[J].中国生物化学与分子生物学报,2013,29(7):604-611
- 2 Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway[J]. Annu Rev Biochem, 2010, 79(1):181-211
- 3 Fattah F, Lee EH, Weisensel N, et al. Ku regulates the non-homologous end joining pathway choice of DNA double-strand break repair in human somatic cells[J]. Plos Genet, 2010, 6(2):e1000855
- 4 Xiong X, Du Z, Wang Y, et al. 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 13:1406
- 5 Bennardo N, Cheng A, Huang N, et al. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair[J]. PLoS Genet, 2008, 4(6):e1000110
- 6 Gunn A, Stark JM. I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks[J]. Methods Mol Biol, 2012, 920:379-391
- 7 Yuan J, Adamski R, Chen J. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be[J]. FEBS Lett, 2010, 584(17):3717-3724
- 8 Pacchierotti F, Ranaldi R, Derijck AA, et al. In vivo repair of DNA damage induced by X-rays in the early stages of mouse fertilization, and the influence of maternal PARP1 ablation[J]. Mutat Res, 2011, 714(1-2):44-52
- 9 Zhenhong L, Bin S, Rebecca A, et al. Dose-response modeling of etoposide-induced DNA damage response[J]. Toxicological Sciences, 2014, 137(2):371-384
- 10 Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, et al. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks[J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(10):6087-6096
- 11 Ferrara L, Parekh-Olmedo H, Kmiec EB. Enhanced oligonucleotide-directed gene targeting in mammalian cells following treatment with DNA damaging agents[J]. Exp Cell Res, 2004, 300(1):170-179
- 12 Quennet V, Beucher A, Baron O, et al. CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1[J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39(6):2144-2152
- 13 Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, et al. Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage[J]. J Biol Chem, 2003, 278(38):35897-35902
- 14 Tammam M, Barr P, Ricci B, et al. Replication-dependent and transcription-dependent mechanisms of DNA double-strand break induction by the topoisomerase 2-targeting drug etoposide[J]. PLoS One, 2013, 8(11):e79202

(收稿日期:2015-01-15)

(修回日期:2015-01-26)

密盖息在老年人股骨颈骨折治疗中的应用研究

任 政 刘修信 沈志敏 宋兴华

摘 要 目的 比较采用髋关节置换联合密盖息与单纯髋关节置换治疗老年股骨颈骨折的疗效。**方法** 回顾性分析笔者医院骨科 2008 年 12 月~2013 年 12 月收治的 84 例老年人新鲜股骨颈骨折患者,根据是否使用密盖息将其划分为两种,实验组为使用密盖息的髋关节置换组($n=43$),对照组为未使用密盖息的髋关节置换组($n=41$)。术后分析两组患者的临床治疗效果及相关并发症的相关性。随访中用 Harris 评分系统进行优良率的统计学分析。**结果** 84 例患者均获两年以上的随访。对照组中有 3 例出现假体松动,2 例出现髋臼塌陷,1 例出现假体远端骨折。其余患者均愈合良好。术后 1 年两组的 Harris 评分差异无统计学意义($P>0.05$),术后 1 年骨密度 T 值两组差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 髋关节置换联合密盖息治疗,可明显改善患者骨密度,提高骨折愈合率,降低再骨折风险

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160218)

作者单位:830002 乌鲁木齐,新疆医科大学第六附属医院骨科